

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月16日

Toshihide EZOE, et al.
BIOSENSOR
Mark Boland
February 18, 2004
6 of 6

Q79759

202-293-7060

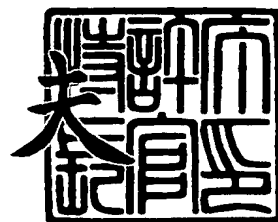
出願番号
Application Number: 特願2003-111565
[ST. 10/C]: [JP2003-111565]

出願人
Applicant(s): 富士写真フイルム株式会社

2004年 1月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康



出証番号 出証特2003-3108544

【書類名】 特許願

【整理番号】 A31214A

【提出日】 平成15年 4月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 久保 利昭

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 江副 利秀

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 田中 秀明

【特許出願人】

 【識別番号】 000005201

 【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

 【識別番号】 110000109

 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

 【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 170347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205141

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオセンサー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜でコーティングした基板から成るバイオセンサー。

【請求項 2】 乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜が有機物である、請求項 1 に記載のバイオセンサー。

【請求項 3】 乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜が、水に対する溶解度が20重量%以下である単量体を50重量%以上含む高分子重合体である、請求項 1 又は 2 に記載のバイオセンサー。

【請求項 4】 乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜が硬膜剤を含有する、請求項 1 から 3 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 5】 乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜でコーティングした金属表面あるいは金属膜から成る、請求項 1 から 4 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 6】 金属表面あるいは金属膜が、金、銀、銅、白金又はアルミニウムから選ばれる自由電子金属からなるものである、請求項 1 から 5 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 7】 非電気化学的検出に使用される、請求項 1 から 6 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 8】 表面プラズモン共鳴分析に使用される、請求項 1 から 7 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 9】 生理活性物質が共有結合により表面に結合している、請求項 1 から 8 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 10】 請求項 1 から 8 の何れかに記載のバイオセンサーと生理活性物質とを接触させて、該バイオセンサーの表面に該生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、バイオセンサーに生理活性物質を固定化する方法。

【請求項 11】 生理活性物質が共有結合により表面に結合している請求項

1 から 8 の何れかに記載のバイオセンサーと被験物質とを接触させる工程を含む、該生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法。

【請求項 1 2】 生理活性物質と相互作用する物質を非電気化学的方法により検出または測定する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】 生理活性物質と相互作用する物質を表面プラズモン共鳴分析により検出または測定する、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、バイオセンサー及びそれを用いた生体分子間の相互作用を分析する方法に関する。特に本発明は、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに用いるためのバイオセンサー及びそれを用いた生体分子間の相互作用を分析する方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

現在、臨床検査等で免疫反応など分子間相互作用を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、測定物質の結合量変化を高感度に検出することのできるいくつかの技術が使用されている。例えば、表面プラズモン共鳴（S P R）測定技術、水晶発振子マイクロバランス（Q C M）測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術である。S P R測定技術はチップの金属膜に接する有機機能膜近傍の屈折率変化を反射光波長のピークシフト又は一定波長における反射光量の変化を測定して求めることにより、表面近傍に起こる吸着及び脱着を検知する方法である。Q C M測定技術は水晶発振子の金電極（デバイス）上の物質の吸脱着による発振子の振動数変化から、n g レベルで吸脱着質量を検出できる技術である。また、金の超微粒子（n m レベル）表面を機能化させて、その上に生理活性物質を固定して、生理活性物質間の特異認識反応を行わせることによって、金微粒子の沈降、配列から生体関連物質の検出ができる。

【0 0 0 3】

上記した技術においては、いずれの場合も、生理活性物質を固定化する表面が重要である。以下、当技術分野で最も使われている表面プラズモン共鳴（SPR）を例として、説明する。

【0004】

一般に使用される測定チップは、透明基板（例えば、ガラス）、蒸着された金属膜、及びその上に生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜からなり、その官能基を介し、金属表面に生理活性物質を固定化する。該生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定することによって、生体分子間の相互作用を分析する。

【0005】

生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜としては、金属と結合する官能基、鎖長の原子数が10以上のリンカー、及び生理活性物質と結合できる官能基を有する化合物を用いて、生理活性物質を固定化した測定チップが報告されている（特許文献1を参照）。また、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜からなる測定チップが報告されている（特許文献2を参照）。

【0006】

一方、生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定する場合、検体物質は必ずしも単一成分ではなく、例えば細胞抽出液中などのような不均一系で検体物質を測定することも要求される。その場合、種々の蛋白質、脂質などの夾雑物が検出表面に非特異的な吸着を起こすと、測定検出感度が著しく低下する。上記の検出表面では、非特異吸着が極めて起こりやすく問題があった。また、測定時のベースラインが不安定になるという問題があった。

【0007】

この問題を解決するためにいくつかの方法が検討されている。例えば、金属表面にリンカーを介し、親水性のハイドロゲルを固定化することで、物理吸着を抑制する方法も使用されてきた（特許文献1、特許文献3及び特許文献4を参照）。しかしながら、この方法でも非特異吸着の抑制性は十分なレベルではなく、測定時のベースラインの安定性の問題も存在していた。

【0008】

**【特許文献 1】**

特許第 2815120 号

【特許文献 2】

特開平 9-264843 号

【特許文献 3】

米国特許第 5436161 号

【特許文献 4】

特開平 8-193948 号公報

【0009】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は上記した従来技術の問題を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、測定時のベースラインを安定化したバイオセンサーを提供することを解決すべき課題とした。

【0010】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、基板の表面を乾燥時の膜厚に対する 25℃の純水での膨潤度の比率が 1 以上 5 以下である膜でコーティングすることによって測定時のベースラインを安定化したバイオセンサーを提供できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本発明によれば、乾燥時の膜厚に対する 25℃の純水での膨潤度の比率が 1 以上 5 以下である膜でコーティングした基板から成るバイオセンサーが提供される。

【0012】

好ましくは、乾燥時の膜厚に対する 25℃の純水での膨潤度の比率が 1 以上 5 以下である膜は有機物である。

好ましくは、乾燥時の膜厚に対する 25℃の純水での膨潤度の比率が 1 以上 5 以下である膜は、水に対する溶解度が 20 重量%以下である単量体を 50 重量%以上含む高分子重合体である。

好ましくは、乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜は硬膜剤を含有する。

【0013】

好ましくは、本発明のバイオセンサーは、乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜でコーティングした金属表面あるいは金属膜から成るバイオセンサーである。

好ましくは、金属表面あるいは金属膜は、金、銀、銅、白金又はアルミニウムから選ばれる自由電子金属からなる。

【0014】

好ましくは、本発明のバイオセンサーは非電気化学的検出に使用することができ、さらに好ましくは表面プラズモン共鳴分析に使用することができる。

【0015】

本発明の別の側面によれば、生理活性物質が共有結合により表面に結合している、上記バイオセンサーが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記バイオセンサーと生理活性物質とを接触させて、該バイオセンサーの表面に該生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、バイオセンサーに生理活性物質を固定化する方法が提供される。

【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、生理活性物質が共有結合により表面に結合している上記バイオセンサーと被験物質とを接触させる工程を含む、該生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法が提供される。

好ましくは、生理活性物質と相互作用する物質を非電気化学的方法により検出または測定することができ、さらに好ましくは、生理活性物質と相互作用する物質を表面プラズモン共鳴分析により検出または測定する。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明のバイオセンサーは、乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜でコーティングした基板から成ることを特徴とする。

本発明で言うバイオセンサーとは最も広義に解釈され、生体分子間の相互作用を電氣的信号等の信号に変換して、対象となる物質を測定・検出するセンサーを意味する。通常のバイオセンサーは、検出対象とする化学物質を認識するレセプター部位と、そこに発生する物理的変化又は化学的変化を電気信号に変換するトランスデューサー部位とから構成される。生体内には、互いに親和性のある物質として、酵素／基質、酵素／補酵素、抗原／抗体、ホルモン／レセプターなどがある。バイオセンサーでは、これら互いに親和性のある物質の一方を基板に固定化して分子認識物質として用いることによって、対応させるもう一方の物質を選択的に計測するという原理を利用している。

【0018】

本発明において、膨潤度の比率は、（膨潤状態での膜厚）／（乾燥状態での膜厚）で表される。膨潤度の比率が大きいと測定中の塩濃度等の変化に対して安定化に時間がかかることになり、微量測定に支障をきたす。膨潤度の比率は、1以上5以下が好ましいが、より好ましくは1以上2以下である。

【0019】

次に、本発明で用いることができる水に対する溶解度が20重量%以下である単体を50重量%以上含む高分子重合体について説明する。

本発明に用いられる高分子重合体を形成する単体の25℃の水に対する溶解度は、新実験化学講座基本操作1（丸善化学、1975）に記載されている方法で測定することができる。この方法で測定すると上記本発明の単体の20℃の水に対する溶解度は、例えば2-エチルヘキシルメタクリレートで0.00重量%、スチレンで0.03重量%、メチルメタクリレートで1.35重量%、ブチルアクリレートで0.32重量%、ブチルメタクリレートで0.03重量%であった。

【0020】

本発明で用いられる水に対する溶解度が20重量%以下である単体の具体例としては、スチレン、メタクリル酸メチル、メタクリル酸ヘキサフルオロプロパン、酢酸ビニル、アクリロニトリルなどが挙げられる。

【0021】

本発明では、前述の水に対する溶解度が20重量%以下である単体と共に、

水に対する溶解度が20重量%以上である単量体を共重合した高分子化合物を併用しても良い。

水に対する溶解度が20重量%以上である単量体の具体例としては、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、メタクリル酸、アクリル酸、アリルアルコール等が挙げられる。

【0022】

本発明の高分子重合体は、水に対する溶解度が20重量%以下である単量体を50重量%以上含むことが好ましい。さらに、水に対する溶解度が20重量%以下である単量体を75%以上含むことがより好ましい。

【0023】

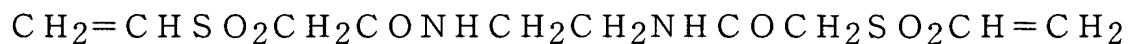
次に、本発明で用いることができる硬膜剤について説明する。

ゼラチンに代表される親水性高分子は、通常、水により大きく膨潤するが、分子内部に架橋することで膨潤を抑えることができる。本発明では、高分子に分子内架橋を形成できる化合物を硬膜剤と呼ぶ。分子内架橋反応としては、共有結合を形成する場合（例えば多価のビニルスルホン化合物、多価のエポキシ化合物、多価のメラミン化合物など）、イオン結合を形成する場合（例えばAl^{III}イオン、Pd^{III}イオン、Cr^{III}イオン、Ca^{II}イオン、Pb^{II}イオン、Mg^{II}イオン、Ba^{II}イオンなど）などがあるが、本発明では特に限定されない。

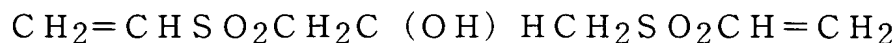
【0024】

具体的化合物としては以下のものが挙げられる。ビニルスルホン化合物としては、下記化合物が挙げられる。

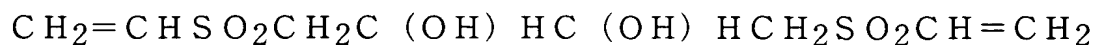
VS-1



VS-2



VS-3



VS-4

$\text{CH}_2=\text{CHSO}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{HCH}_2\text{C}(\text{OH})\text{HCH}_2\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$

エポキシ化合物としては、デナコールEX521（ナガセ化成工業（株）製）、メラミン化合物としては スミテックスレジンM-3（住友化学工業（株）製）などが挙げられる。

また、無機塩としては、 $\text{Al}_3(\text{SO}_4)_2$ などが挙げられる。

【0025】

上記した高分子重合体の基板へのコーティングは常法によって行うことができ、例えば、スピン塗布、エアナイフ塗布、バー塗布、ブレード塗布、スライド塗布、カーテン塗布、さらにはスプレー法、蒸着法、キャスト法、浸漬法等によって行うことができる。

【0026】

膜のコーティング厚さは特に限定されないが、好ましくは1オングストローム以上5000オングストローム以下であり、特に好ましくは10オングストローム以上3000オングストローム以下である。

【0027】

本発明のバイオセンサーは、金属表面又は金属膜を膜でコーティングしたものであることが好ましい。金属表面あるいは金属膜を構成する金属としては、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。好ましくは金、銀、銅、アルミニウム、白金等の自由電子金属が挙げられ、特に金が好ましい。それらの金属は単独又は組み合わせて使用することができる。また、上記基板への付着性を考慮して、基板と金属からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【0028】

金属膜の膜厚は任意であるが、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、1オングストローム以上5000オングストローム以下であるのが好ましく、特に10オングストローム以上2000オングストローム以下であるのが好ましい。5000オングストロームを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、1オングストローム以上、100オングストローム以

下であるのが好ましい。

【0029】

金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。

【0030】

金属膜は好ましくは基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置される」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む意味である。本発明で使用するすることができる基板としては例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、一般的にはBK7等の光学ガラス、あるいは合成樹脂、具体的にはポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、シクロオレフィンポリマーなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。

【0031】

上記したような乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜でコーティングした基板から成る本発明のバイオセンサーにおいては、基板の最表面に生理活性物質を固定化することができる官能基を有することが好ましい。ここで言う「基板の最表面」とは、「基板から最も遠い側」という意味であり、さらに具体的には、「基板上にコーティングした膜中の基板から最も遠い側」という意味である。

【0032】

好ましい官能基としては $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 、 $-NR^1R^2$ （式中、 R^1 及び R^2 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-CHO$ 、 $-NR^3NR^1R^2$ （式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-NCO$ 、 $-NCS$ 、エポキシ基、またはビニル基などが挙げられる。ここで、低級アルキル基における炭素数は特に限定されないが、一般的にはC1～C10程度であり、好ましくはC1～C6である。

【0033】

最表面にそれらの官能基を導入する方法としては、それらの官能基の前駆体を含有する高分子を金属表面あるいは金属膜上にコーティングした後、化学処理により最表面に位置する前駆体からそれらの官能基を生成させる方法が挙げられる。例えば $-COOCH_3$ 基を含有する高分子化合物であるポリメチルメタクリレート（PMMA）を金属膜上にコーティングした後、その表面をNaOH水溶液（1N）に40℃16時間接触させると、最表面に $-COOH$ 基が生成する。

【0034】

上記のようにして得られたバイオセンサー用表面において、上記の官能基を介して生理活性物質を共有結合させることによって、金属表面又は金属膜に生理活性物質を固定化することができる。

【0035】

本発明のバイオセンサー上に固定される生理活性物質としては、測定対象物と相互作用するものであれば特に限定されず、例えば免疫蛋白質、酵素、微生物、核酸、低分子有機化合物、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖鎖、脂肪酸もしくは脂肪酸エステル、あるいはリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドなどが挙げられる。

【0036】

免疫蛋白質としては、測定対象物を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、IgA、IgE、IgDを使用することができる。具体的には、測定対象物がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157などに対する抗体等を使用することができる。

【0037】

酵素としては、測定対象物又は測定対象物から代謝される物質に対して活性を

示すものであれば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、測定対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、測定対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

【0038】

微生物としては、特に限定されることなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物を使用することができる。

核酸としては、測定の対象とする核酸と相補的にハイブリダイズするものを使用することができる。核酸は、DNA（cDNAを含む）、RNAのいずれも使用できる。DNAの種類は特に限定されず、天然由来のDNA、遺伝子組換え技術により調製した組換えDNA、又は化学合成DNAの何れでもよい。

低分子有機化合物としては通常の有機化学合成の方法で合成することができる任意の化合物が挙げられる。

【0039】

非免疫蛋白質としては、特に限定されることなく、例えばアビジン（ストレプトアビジン）、ビオチン又はレセプターなどを使用できる。

免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテインG、リウマチ因子（RF）等を使用することができる。

糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられる。

脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ベヘン酸エチル等が挙げられる。

【0040】

生理活性物質が抗体や酵素などの蛋白質又は核酸である場合、その固定化は、

生理活性物質のアミノ基、チオール基等を利用し、金属表面の官能基に共有結合させることで行うことができる。

【0041】

上記のようにして生理活性物質を固定化したバイオセンサーは、当該生理活性物質と相互作用する物質の検出及び／又は測定のために使用することができる。

【0042】

即ち、本発明によれば、生理活性物質が固定化された本発明のバイオセンサーを用いて、これに被験物質を接触させることにより、該バイオセンサーに固定化されている生理活性物質と相互作用する物質を検出及び／又は測定する方法が提供される。

被験物質としては例えば、上記した生理活性物質と相互作用する物質を含む試料などを使用することができる。

【0043】

本発明では、バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用を非電気化学的方法により検出及び／又は測定することが好ましい。非電気化学的方法としては、表面プラズモン共鳴（SPR）測定技術、水晶発振子マイクロバランス（QCM）測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術などが挙げられる。

【0044】

本発明の好ましい態様によれば、本発明のバイオセンサーは、例えば、透明基板上に配置される金属膜を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴用バイオセンサーとして用いることができる。

【0045】

表面プラズモン共鳴用バイオセンサーとは、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用されるバイオセンサーであって、該センサーより照射された光を透過及び反射する部分、並びに生理活性物質を固定する部分とを含む部材を言い、該センサーの本体に固着されるものであってもよく、また脱着可能なものであってもよい。

【0046】

表面プラズモン共鳴の現象は、ガラス等の光学的に透明な物質と金属薄膜層との境界から反射された単色光の強度が、金属の出射側にある試料の屈折率に依存することによるものであり、従って、反射された単色光の強度を測定することにより、試料を分析することができる。

【0047】

表面プラズモンが光波によって励起される現象を利用して、被測定物質の特性を分析する表面プラズモン測定装置としては、Kretschmann配置と称される系を用いるものが挙げられる（例えば特開平6-167443号公報参照）。上記の系を用いる表面プラズモン測定装置は基本的に、例えばプリズム状に形成された誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成されて試料液などの被測定物質に接触させられる金属膜と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように種々の角度で入射させる光学系と、上記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態、つまり全反射減衰の状態を検出する光検出手段とを備えてなるものである。

【0048】

なお上述のように種々の入射角を得るためには、比較的細い光ビームを入射角を変化させて上記界面に入射させてもよいし、あるいは光ビームに種々の角度で入射する成分が含まれるように、比較的太い光ビームを上記界面に収束光状態あるいは発散光状態で入射させてもよい。前者の場合は、入射した光ビームの入射角の変化に従って、反射角が変化する光ビームを、上記反射角の変化に同期して移動する小さな光検出器によって検出したり、反射角の変化方向に沿って延びるエリアセンサによって検出することができる。一方後者の場合は、種々の反射角で反射した各光ビームを全て受光できる方向に延びるエリアセンサによって検出することができる。

【0049】

上記構成の表面プラズモン測定装置において、光ビームを金属膜に対して全反射角以上の特定入射角で入射させると、該金属膜に接している被測定物質中に電界分布をもつエバネッセント波が生じ、このエバネッセント波によって金属膜と

被測定物質との界面に表面プラズモンが励起される。エバネッセント光の波数ベクトルが表面プラズモンの波数と等しくて波数整合が成立しているとき、両者は共鳴状態となり、光のエネルギーが表面プラズモンに移行するので、誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射した光の強度が鋭く低下する。この光強度の低下は、一般に上記光検出手段により暗線として検出される。なお上記の共鳴は、入射ビームが p 偏光のときにだけ生じる。したがって、光ビームが p 偏光で入射するように予め設定しておく必要がある。

【0050】

この全反射減衰 (ATR) が生じる入射角、すなわち全反射減衰角 (θ_{SP}) より表面プラズモンの波数が分かると、被測定物質の誘電率が求められる。この種の表面プラズモン測定装置においては、全反射減衰角 (θ_{SP}) を精度良く、しかも大きなダイナミックレンジで測定することを目的として、特開平 11-326194 号公報に示されるように、アレイ状の光検出手段を用いることが考えられている。この光検出手段は、複数の受光素子が所定方向に配設されてなり、前記界面において種々の反射角で全反射した光ビームの成分をそれぞれ異なる受光素子が受光する向きにして配設されたものである。

【0051】

そしてその場合は、上記アレイ状の光検出手段の各受光素子が出力する光検出信号を、該受光素子の配設方向に関して微分する微分手段が設けられ、この微分手段が出力する微分値に基づいて全反射減衰角 (θ_{SP}) を特定し、被測定物質の屈折率に関連する特性を求めることが多い。

【0052】

また、全反射減衰 (ATR) を利用する類似の測定装置として、例えば「分光研究」第 47 巻 第 1 号 (1998) の第 21～23 頁および第 26～27 頁に記載がある漏洩モード測定装置も知られている。この漏洩モード測定装置は基本的に、例えばプリズム状に形成された誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成されたクラッド層と、このクラッド層の上に形成されて、試料液に接触させられる光導波層と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを上記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックとクラッド層との界面で全反射条件が

得られるように種々の角度で入射させる光学系と、上記界面で全反射した光ビームの強度を測定して導波モードの励起状態、つまり全反射減衰状態を検出する光検出手段とを備えてなるものである。

【0053】

上記構成の漏洩モード測定装置において、光ビームを誘電体ブロックを通してクラッド層に対して全反射角以上の入射角で入射させると、このクラッド層を透過した後に光導波層においては、ある特定の波数を有する特定入射角の光のみが導波モードで伝搬するようになる。こうして導波モードが励起されると、入射光のほとんどが光導波層に取り込まれるので、上記界面で全反射する光の強度が鋭く低下する全反射減衰が生じる。そして導波光の波数は光導波層の上の被測定物質の屈折率に依存するので、全反射減衰が生じる上記特定入射角を知ることで、被測定物質の屈折率や、それに関連する被測定物質の特性を分析することができる。

【0054】

なおこの漏洩モード測定装置においても、全反射減衰によって反射光に生じる暗線の位置を検出するために、前述したアレイ状の光検出手段を用いることができ、またそれと併せて前述の微分手段が適用されることも多い。

【0055】

また、上述した表面プラズモン測定装置や漏洩モード測定装置は、創薬研究分野等において、所望のセンシング物質に結合する特定物質を見いだすランダムスクリーニングへ使用されることがあり、この場合には前記薄膜層（表面プラズモン測定装置の場合は金属膜であり、漏洩モード測定装置の場合はクラッド層および光導波層）上に上記被測定物質としてセンシング物質を固定し、該センシング物質上に種々の被検体が溶媒に溶かされた試料液を添加し、所定時間が経過する毎に前述の全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角度を測定している。

【0056】

試料液中の被検体が、センシング物質と結合するものであれば、この結合によりセンシング物質の屈折率が時間経過に伴って変化する。したがって、所定時間経過毎に上記全反射減衰角（ θ_{SP} ）を測定し、該全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角

度に変化が生じているか否か測定することにより、被検体とセンシング物質の結合状態を測定し、その結果に基づいて被検体がセンシング物質と結合する特定物質であるか否かを判定することができる。このような特定物質とセンシング物質との組み合わせとしては、例えば抗原と抗体、あるいは抗体と抗体が挙げられる。具体的には、ウサギ抗ヒト IgG 抗体をセンシング物質として薄膜層の表面に固定し、ヒト IgG 抗体を特定物質として用いることができる。

【0057】

なお、被検体とセンシング物質の結合状態を測定するためには、全反射減衰角 (θ_{SP}) の角度そのものを必ずしも検出する必要はない。例えばセンシング物質に試料液を添加し、その後の全反射減衰角 (θ_{SP}) の角度変化量を測定して、その角度変化量の大小に基づいて結合状態を測定することもできる。前述したアレイ状の光検出手段と微分手段を全反射減衰を利用した測定装置に適用する場合であれば、微分値の変化量は、全反射減衰角 (θ_{SP}) の角度変化量を反映しているため、微分値の変化量に基づいて、センシング物質と被検体との結合状態を測定することができる（本出願人による特願 2000-398309 号参照）。このような全反射減衰を利用した測定方法および装置においては、底面に予め成された薄膜層上にセンシング物質が固定されたカップ状あるいはシャーレ状の測定チップに、溶媒と被検体からなる試料液を滴下供給して、上述した全反射減衰角 (θ_{SP}) の角度変化量の測定を行っている。

【0058】

さらに、ターンテーブル等に搭載された複数個の測定チップの測定を順次行うことにより、多数の試料についての測定を短時間で行うことができる全反射減衰を利用した測定装置が、特開 2001-330560 号公報に記載されている。

【0059】

本発明のバイオセンサーを表面プラズモン共鳴分析に使用する場合、上記したような各種の表面プラズモン測定装置の一部として適用することができる。

以下の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0060】

【実施例】

以下の実験は、特開 2001-330560 号公報の図 22 に記載の装置（以下、本発明の表面プラズモン共鳴測定装置と呼ぶ）、及び同公報の図 23 に記載の誘電体ブロック（以下、本発明の誘電体ブロックと呼ぶ）を用いて行った。

【0061】**実施例 1：測定チップの作製****（1）比較例：デキストランで被覆処理した測定チップの作製**

金属膜として 50nm の金が蒸着された本発明の誘電体ブロックを Model-208 UV-オゾンクリーニングシステム（TECHNOVISION INC.）で 30 分間処理した後、エタノール／水（80/20）中 11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオール の 5.0mM 溶液を金属膜に接触するように添加し、25℃ で 18 時間表面処理を行った。その後、エタノールで 5 回、エタノール／水混合溶媒で 1 回、水で 5 回洗浄を行った。

【0062】

次に、11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオールで被覆した表面を 10 重量% のエピクロロヒドリン溶液（溶媒：0.4M 水酸化ナトリウム及びジエチレングリコールジメチルエーテルの 1：1 混合溶液）に接触させ、25℃ の振盪インキュベーター中で 4 時間反応を進行させた。表面をエタノールで 2 回、水で 5 回洗浄した。

【0063】

次に、25 重量% のデキストラン（T500, Pharmacia）水溶液 40.5ml に 4.5ml の 1M 水酸化ナトリウムを添加し、その溶液をエピクロロヒドリン処理表面上に接触させた。次に振盪インキュベーター中で 25℃ で 20 時間インキュベートした。表面を 50℃ の水で 10 回洗浄した。

【0064】

続いて、ブromo酢酸 3.5g を 27g の 2M 水酸化ナトリウム溶液に溶解した混合物を上記デキストラン処理表面に接触させて、28℃ の振盪インキュベーターで 16 時間インキュベートした。表面を水で洗浄し、その後上述の手順を 1 回繰り返した。このサンプルをデキストラン表面チップと呼ぶ。

【0065】**（2）ポリメチルメタクリレート（PMMA）膜の作成**

金属膜として50nmの金が蒸着された本発明の誘電体ブロックをModel-208 U Vーオゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した後、1mg/mlのポリメチルメタクリレートのメチルエチルケトン溶液5 μ l を金属膜に接触するように添加し、25℃で15分間静置した。

【 0 0 6 6 】

(3) ポリメチルメタクリレート膜をN a O Hで処理した測定チップの作成

前記(2)で得られたサンプルに1N NaOH水溶液をPMMA膜に接触するように添加し、60℃5時間静置した後、水で3回洗浄した。このサンプルをPMMA/NaOH処理チップと呼ぶ。

【 0 0 6 7 】

(4) ポリスチレン (PS) 膜の作成

金属膜として50nmの金が蒸着された本発明の誘電体ブロックをModel-208 U Vーオゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した後、1mg/mlのポリスチレンのメチルエチルケトン溶液5 μ l を金属膜に接触するように添加し、5℃で15分間静置した。

【 0 0 6 8 】

(5) ポリスチレン膜をオゾン処理した測定チップの作成

前記(2)で得られたサンプルをModel-208 U Vーオゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した。このサンプルをPS/オゾン処理チップと呼ぶ。

【 0 0 6 9 】

(6) ゼラチン (Gel) 膜の作成

金属膜として50nmの金が蒸着された本発明の誘電体ブロックをModel-208 U Vーオゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した後、0.1重量%のゼラチンと表1に記載の重量%の化合物Aもしくは硫酸アルミニウムの混合物の水溶液5 μ l を金属膜に接触するように添加し、25℃で15分間静置した。このサンプルをゼラチン膜チップと呼ぶ。

【 0 0 7 0 】

(7) ポリビニルアルコール (PVA) 膜の作成

金属膜として50nmの金が蒸着された本発明の誘電体ブロックをModel-208 UV-オゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した後、0.1重量%のポリビニルアルコール (MP103：クラレ (株) 製) と表1に記載の重量%のスミテックスレジンM-3 (80%水溶液：住友化学工業 (株) 製) の混合物の水溶液5 μ lを金属膜に接触するように添加し、25℃で15分間静置した。このサンプルをPVA膜チップと呼ぶ。

【0071】

化合物A： $\text{CH}_2=\text{CHSO}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NHCO}-\text{CH}_2\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$

【0072】

実施例2：測定チップの性能評価：

(1) 測定時のベースライン安定性の評価

特に低分子の検体化合物の結合を検出する場合、測定時のベースラインが不安定であると、その結合を検出することが極めて困難となる。

【0073】

各チップの膜の水に対する膨潤度は、乾燥状態、及び25℃の純水で膨潤させた状態を25℃の環境下でSII社SPA400型SPMのAFMモードにて測定した。膨潤度の比率を表1に示す。

【0074】

ベースラインの安定性は以下の方法で評価した。まず、測定チップを本発明の表面プラズモン共鳴測定装置に設置し、水を添加した。30分放置後、水を抜き取り、HBS-Nバッファ (HEPES 0.01mol/l (pH 7.4) ; NaCl 0.15mol/l) を添加した。そのまま30分間静置し、その間の共鳴シグナル (RU値) 変化量を記録した。置換後5分～15分の間の共鳴シグナル (RU値) 変化量 ($\Delta 5-15$) と置換後20分～30分の間の共鳴シグナルの変化量 ($\Delta 20-30$) を測定した。この共鳴シグナル (RU値) 変化量は各々10RU以下であることが好ましく、5RU以下であることがさらに好ましい。また、 $\Delta 5-15$ と $\Delta 20-30$ の差は5RU以下であることが好ましい。

【0075】

(4) 結果

表 1 に測定時のベースラインの安定性の測定結果を示す。

【 0 0 7 6 】

【表 1】

表1.

No.	サンプル		モノマーの溶解度	硬膜剤種、量	膨潤度の比率	ベースラインの安定性 (Δ RU値)		備考
						Δ 5-15	Δ 20-30	
1-1	デキストラン表面膜		—	—	30	-53	-29	比較例
1-2	PMMA膜		1.35重量%	—	1	-3	-2	本発明
1-3	PMMA/NaOH膜		1.35重量%	—	1.05	-5	-3	本発明
1-4	PS膜		0.03重量%	—	1	-2	-1	本発明
1-5	PS/オゾン膜		0.03重量%	—	1.1	-7	-4	本発明
1-6-1	ゼラチン膜-1		—	—	20	-48	-21	比較例
1-6-2	ゼラチン膜-2		—	化合物A:0.0001重量%	10	-34	-12	比較例
1-6-3	ゼラチン膜-3		—	化合物A:0.001重量%	5	-20	-9	本発明
1-6-4	ゼラチン膜-4		—	化合物A:0.01重量%	2	-9	-6	本発明
1-6-5	ゼラチン膜-5		—	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$:0.0001重量%	8	-25	-16	比較例
1-6-6	ゼラチン膜-6		—	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$:0.001重量%	3	-10	-9	本発明
1-6-7	ゼラチン膜-7		—	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$:0.01重量%	1.2	-5	-3	本発明
1-7-1	PVA膜-1		∞	—	25	-19	-12	比較例
1-7-2	PVA膜-2		∞	M-3:0.001重量%	12	-12	-8	比較例
1-7-3	PVA膜-3		∞	M-3:0.01重量%	4	-5	-4	本発明

【0077】

表1の結果から、乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜でコーティングした基板から成る本発明のバイオセンサーを用いることにより、測定時のベースラインを安定化できることがわかる。

【0078】**【発明の効果】**

本発明により、測定時のベースラインの安定性を改善したバイオセンサー用検出表面を提供することが可能になった。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 測定時のベースラインを安定化したバイオセンサーを提供すること。

【解決手段】 乾燥時の膜厚に対する25℃の純水での膨潤度の比率が1以上5以下である膜でコーティングした基板から成るバイオセンサー。

【選択図】 なし

特願 2003-111565

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005201]

1. 変更年月日

1990年 8月14日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼210番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社